昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, October 2016, 59(10): 1079-1085 doi:10.16380/j.kcxb.2016.10.006

中华蜜蜂工蜂咽下腺胚后发育过程中细胞的增殖和凋亡

李兆英, 余红梅, 孙 艳, 孙 婧

(陕西学前师范学院生命科学与食品工程学院, 西安 710061)

摘要:【目的】咽下腺(hypopharyngeal gland)是蜜蜂重要的外分泌腺,是工蜂合成和分泌蜂王浆的主要腺体。本研究的目的在于了解中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂咽下腺的胚后发育特点。【方法】通过组织形态学、BrdU 免疫组织化学和 TUNEL 细胞凋亡检测等技术,对中华蜜蜂工蜂咽下腺的胚后发育过程及组织结构特点进行了比较研究。【结果】中华蜜蜂工蜂的咽下腺起源自预蛹阶段口器内壁的陷入,细胞分裂活动的高峰期集中在蛹发育的前 3 d,随后分裂细胞数减少,并一直持续到蛹发育的第 7 天左右结束;分泌腺泡的出现大约在蛹发育的第 5 天。到蛹发育的末期,咽下腺已基本形成,但是没有发育完全;哺育蜂的咽下腺高度发育,分泌活动旺盛;采集蜂的咽下腺中有许多分泌细胞凋亡。【结论】本研究揭示了中蜂工蜂咽下腺胚后发育过程中细胞增殖和凋亡的模式,为昆虫咽下腺的发育和功能研究提供了一定的理论依据。

关键词: 中华蜜蜂; 咽下腺; 5-溴-2-脱氧脲嘧啶; 细胞凋亡; 胚后发育

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)10-1079-07

Cell proliferation and programmed cell death in the hypopharyngeal gland of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) workers during postembryonic development

LI Zhao-Ying, YU Hong-Mei, SUN Yan, SUN Jing (Life Science and Food Engineering College, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710061, China)

Abstract:【Aim】The hypopharyngeal gland of honeybee is responsible for secreting royal jelly. This study aims to understand the postembryonic development of the hypopharyngeal gland of workers of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. 【Methods】The postembryonic developmental process and structure characteristics of the hypopharyngeal gland of *A. c. cerana* workers were comparatively studied by using histological, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation and the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) techniques. 【Results】The results showed that the hypopharyngeal gland of *A. c. cerana* workers is originated from evaginations of the dorsal portion of the mouthpart during the prepupal stage, and extensive proliferation in the hypopharyngeal gland is detected only in the first three days of pupal development. Proliferative nuclei disappear on the 7th day of pupal development. The acinis divide on the 5th day of pupal development. In late pupae, the acinis of hypopharyngeal gland form but has not grown to full size. The hypopharyngeal gland is highly developed in nursing workers. Programmed cell death (PCD) predominates in older foraging workers. 【Conclusion】This study reveals the cell proliferation and apoptosis pattern of the hypopharyngeal gland of *A. c. cerana* workers during postembryonic development, providing an essential foundation for studying the development and function of insect hypopharyngeal gland.

Key words: *Apis cerana cerana*; hypopharyngeal gland; BrdU; programmed cell death (PCD); postembryonic development

---

基金项目:陕西省教育厅科技计划项目(2013JK0719);大学生创新创业训练计划项目(201514390766, 2306)

作者简介:李兆英,女,1971 年生,山东青州人,博士研究生,教授,研究方向为昆虫生理及发育,E-mail: apis2006@163.com

收稿日期 Received: 2016-06-10; 接受日期 Accepted: 2016-09-14

咽下腺(hypopharyngeal gland)又称王浆腺(jelly gland)、营养腺(food gland),是蜜蜂合成、分泌蜂王浆的主要腺体。它是位于工蜂头腔内的一对高度盘绕的葡萄状腺体,一端连于口片侧角,另一端游离。每条咽下腺由一根分泌管和数百个腺泡(acini)组成,而每个腺泡又是由数个分泌细胞聚集而成。每个分泌细胞都发出胞内管(intracellular tubule),胞内管盘绕在细胞核周围,收集分泌物,后延伸成胞外管(extracellular tubule),许多分泌细胞的胞外管平行排列,同分泌管(secretory duct)相连(Snodgrass, 1956)。

咽下腺从蛹发育早期开始分化,到 7 日龄左右腺泡已基本形成,但是到羽化时还未发育完全,直到成蜂出巢,咽下腺才逐渐发育成熟。工蜂取食的营养物质经此腺体转化成蜂王浆,通过导管分泌到口器外,饲喂蜂王以及蜂王、工蜂和雄蜂的幼虫;而到工蜂出巢采集时,随着蜡腺的发育,咽下腺分泌蜂王浆的机制被抑制,逐渐萎缩退化,转而分泌其他的蛋白质和酶类(Deseyn and Billen, 2005)。

对昆虫咽下腺形态、结构以及功能特点,国内外学者进行了许多研究。杜芝兰和张宗炳(1984)对中华蜜蜂 *Apis cerana*(下称"中蜂")成年工蜂咽下腺细胞的超微结构进行了观察,描述了咽下腺细胞中各种细胞器的形态特征。韩胜明(2002)对意大利蜜蜂 *Apis mellifera*(下称"意蜂")咽下腺的形态结构进行了研究,结果显示,工蜂随其职能分工不同,营养腺的形态结构有相应的变化。马卫华等(2012)对意蜂成年工蜂咽下腺的显微和超微结构进行了观察,并对咽下腺内部的细胞类型及其功能进行了描述。Deseyn 和 Billen(2005)研究了意蜂工蜂咽下腺的组织形态和超微结构,描述了咽下腺分泌细胞的分泌周期以及不同周期内细胞的形态变化特点。Suwannapong 等(2010)比较了意蜂和中蜂不同工种工蜂咽下腺的组织结构,发现蜜蜂咽下腺的发育同年龄密切相关,哺育蜂的咽下腺明显大于守卫蜂和采集蜂;而意蜂的咽下腺蛋白储存要高于中蜂。Cruz-Landim 和 Mello(1967)通过对无刺蜂 *Melipona quadrifasciata anthidioides* 头部腺体的研究显示,咽下腺从蛹早期开始发育,它源自咽腹前侧体壁的内陷,胞内管和胞外管由管壁细胞分化而来。Elaidy(2014)对意蜂工蜂咽下腺的超微结构进行了比较研究,结果显示,羽化 3 d 后的工蜂,分泌细胞胞质均匀,没有分泌活动;9 d 时,胞质分化并出现分泌物;21 d 时,分泌活动最旺盛。对蜜蜂咽下腺发育状况的研究主要集中在不同工种的成年工蜂,而其蛹期的发育特点未见报道。

大量研究显示,昆虫在胚后发育过程中组织结构存在程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)(Bowen *et al*., 1996; 史艳霞等, 2009; 李兆英, 2011)。丽蝇 *Calliphora vomitoria* 幼虫退化的唾液腺细胞显示了空泡、肿胀等凋亡特征(Bowen *et al*., 1996)。意蜂工蜂从 5 龄幼虫到预蛹的发育阶段,分泌细胞出现了空泡化以及胞核固缩、胞质释放等细胞凋亡的典型特征(Silva-Zacarin *et al*., 2007)。工蜂从哺育蜂到采集蜂的职能转换过程中,咽下腺体积缩小,分泌细胞内部出现空泡等细胞凋亡特征,同时伴随有高水平的自噬和由酸性磷酸酶引起的细胞水解活动(Silva de Moraes and Bowen, 2000)。

本研究通过形态解剖、BrdU 免疫组织化学(5-bromo-2-deoxyuridine incorporation, BrdU)以及原位末端转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测等技术,对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂咽下腺的胚后发育过程及组织结构特点进行了比较研究,为咽下腺的发育及分泌机理的研究提供一定的理论证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的中华蜜蜂 *A. c. cerana* 蛹及成虫均采自秦岭大峪中华蜜蜂养殖基地,随机选取中蜂蜂群 1 群,提取巢脾,采集预蛹(prepupa, PP)及各发育阶段蛹(pupa, P)(1-9 日龄蛹, 分别记为 P1-P9),其中 PP, P1, P3(P5 各 5 头,P2 和 P8 各 4 头,P6, P7 和 P9 各 3 头。哺育蜂直接从巢脾上捕获,采集蜂为巢门口采集归巢携带花粉的工蜂,其中哺育蜂 10 头,采集蜂 6 头。

1.2 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)组织化学方法

中华蜜蜂哺育蜂、采集蜂各 5 头的头部,多聚甲醛 4℃固定过夜。梯度酒精脱水,二甲苯透明。石蜡包埋,横向连续切片,切片厚度 5~7 μm,切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烘干备用。切片脱蜡后复水,HE 染色,OLYMPUS(BX51)显微镜观察拍照。

1.3 BrdU 免疫组织化学方法

1.3.1 BrdU 掺入处理:取中华蜜蜂工蜂的预蛹、1-9 日龄蛹和成虫活体各 3~5 头,从头部触角基

部注射约 3 μL 浓度为 25 mg/mL 的 BrdU（B9002，Sigma），掺入时间为 8 h。

1.3.2 BrdU 免疫组织化学染色：将 BrdU 处理过的预蛹、蛹和成虫取头部，4% 多聚甲醛 4℃固定 8 h。70%，80%，90%，95% 和 100% 梯度酒精脱水，石蜡包埋，横向连续切片，厚度为 7 μm。切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上，烘干备用。

切片用二甲苯脱蜡，入梯度酒精复水；抗原修复，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗 3 次；3% 过氧化氢封闭内源性酶 10 min，Tris-HCl 缓冲液（Tris-HCl buffered saline，TBS）洗 3 次；滴加正常山羊血清封闭液，37℃ 30 min；滴加小鼠 BrdU 单克隆抗体（1/200）（ab8039，ABCAM），湿盒中 4℃孵育过夜，PBS 洗 3 次。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG，37℃ 120 min，PBS 洗 3 次；滴加过氧化物酶 37℃孵育 30 min，PBS 洗 3 次；二氨基联苯胺（3，3′-diaminobenzidine，DAB）显色后镜检，中性树胶封片，Nikon 数码显微成像系统（DS-5M）拍照。

阴性对照以 PBS 代替一抗，其余步骤同上。

1.4　TUNEL 原位细胞凋亡检测

切片用二甲苯脱蜡，入梯度酒精复水；复合消化液（蛋白酶 K-胃蛋白酶）37℃孵育 20 min，PBS 洗 2 次；滴加新鲜配制的 TUNEL 反应混合溶液（Roche），湿盒中 37℃孵育 60 min，PBS 洗 3 次；滴加转化剂 POD，37℃孵育 30 min，PBS 洗 3 次；DAB 显色后镜检，中性树胶封片，Nikon 数码显微成像系统（DS-5M）拍照。

阴性对照以不含末端脱氧核糖核酸转移酶的核苷酸混合液代替 TUNEL 反应混合溶液。

1.5　数据分析

利用 TSView 7 图像分析软件测量腺泡直径、分泌细胞以及细胞核的大小；利用 Excel 计算平均值及标准误。

2　结果

2.1　中华蜜蜂咽下腺的胚后发育

中蜂咽下腺的发育是从预蛹（PP）开始的。在预蛹期，口器背侧体壁内陷，咽下腺开始分化，细胞分裂活跃（图 1：A）；同时，在细胞增殖活跃的部位，TUNEL 标记显示有部分的细胞凋亡（图 1：B）。到蛹发育的早期（P1），可明显看到由口器体壁内陷形成的 2 个长囊，囊壁细胞快速地分裂增殖（图 1：C），内侧的细胞略呈长柱形，外侧的细胞较圆（图 1：D）；这时咽下腺囊长为 499.0 ± 36.9 μm。蛹发育的第 2 天（P2），细胞继续快速分裂，咽下腺的囊已延伸至咽（图 1：E）；TUNEL 标记显示了在细胞增殖活跃的区域只有少数的细胞凋亡（图 1：F）。蛹发育的第 3 天（P3），咽下腺囊已延伸到咽的侧面，并有向颜面外侧延伸的趋势（图 1：G）；囊壁由多层圆球形的细胞构成，并且不再光滑，开始出现皱褶弯曲（图 1：H）；TUNEL 标记的阳性细胞依然存在（图 1：I）。此时咽下腺囊长为 670.0 ± 41.5 μm。蛹发育的第 4 天（P4），咽下腺已延伸至颜面部的侧面，并离散成几个囊（图 1：J）；囊内侧的细胞狭长形，垂直于囊腔，没有细胞分裂；外侧细胞略呈椭圆形，仍然有许多细胞在分裂（图 1：K）。到蛹发育的第 5 天（P5），咽下腺囊已经离散，常常数个细胞聚集在一起形成一簇一簇的分泌单位——腺泡（图 1：L），直径为 50.0 ± 4.3 μm；胞内管和胞外管已形成，几个胞外管联合在一起形成分泌管；此阶段仍有细胞在分裂（图 1：M）。到蛹发育的第 7 天（P7），只剩下个别的细胞还在分裂（图 1：N）。到蛹发育的末期（P8），细胞分裂活动停止，咽下腺已基本形成；腺泡的大小没有变化；细胞核大，染色质浓缩（图 1：O）。

2.2　中华蜜蜂成年工蜂咽下腺的发育

刚羽化出房的工蜂，每个腺泡仍由数个细胞聚集而成，体积同蛹发育末期没有太大变化，为 50.1 ± 5.7 μm（图 2：A）；分泌细胞较小，圆球形，直径为 18.0 ± 3.0 μm，胞核大，染色质浓缩；分泌管中没有分泌物（图 2：B，C）。随着工蜂日龄的增加，腺泡的体积逐渐增大并饱满起来（图 2：D）；胞核变大，染色质浓缩，胞质强嗜碱性；胞质中开始出现小泡；胞内管和胞外管明显；分泌管中出现分泌物（图 2：E，F）。此时咽下腺腺泡的直径为 87.0 ± 13.9 μm，分泌细胞的直径为 32.2 ± 2.4 μm。成熟的哺育蜂，咽下腺高度发育，但是处于头腔不同部位的腺泡的发育状况存在差异：靠近口器的腺泡的体积明显大于上部以及顶部的腺泡（图 2：G），最大的直径可达到 200 μm 左右，分泌细胞的直径可达到约 60 μm；这些分泌细胞中充满了大小不一的囊泡，胞核小，常常被挤在细胞的边缘（图 2：I）；而中部及上部的细胞则胞核较大，胞质中的囊泡少而小；腺泡直径为 103.5 ± 9.2 μm，分泌细胞的直径约为 55.0 ± 5.7 μm（图 2：H）。成熟的采集蜂腺泡的数量变少，体积变小；分泌细胞之间的间隙增大；细胞皱缩，胞膜损坏，胞质中有大量的空泡，一些细胞的胞核破碎（图 2：J）；TUNEL 标记显示了大量的细胞凋亡（图 2：K）。

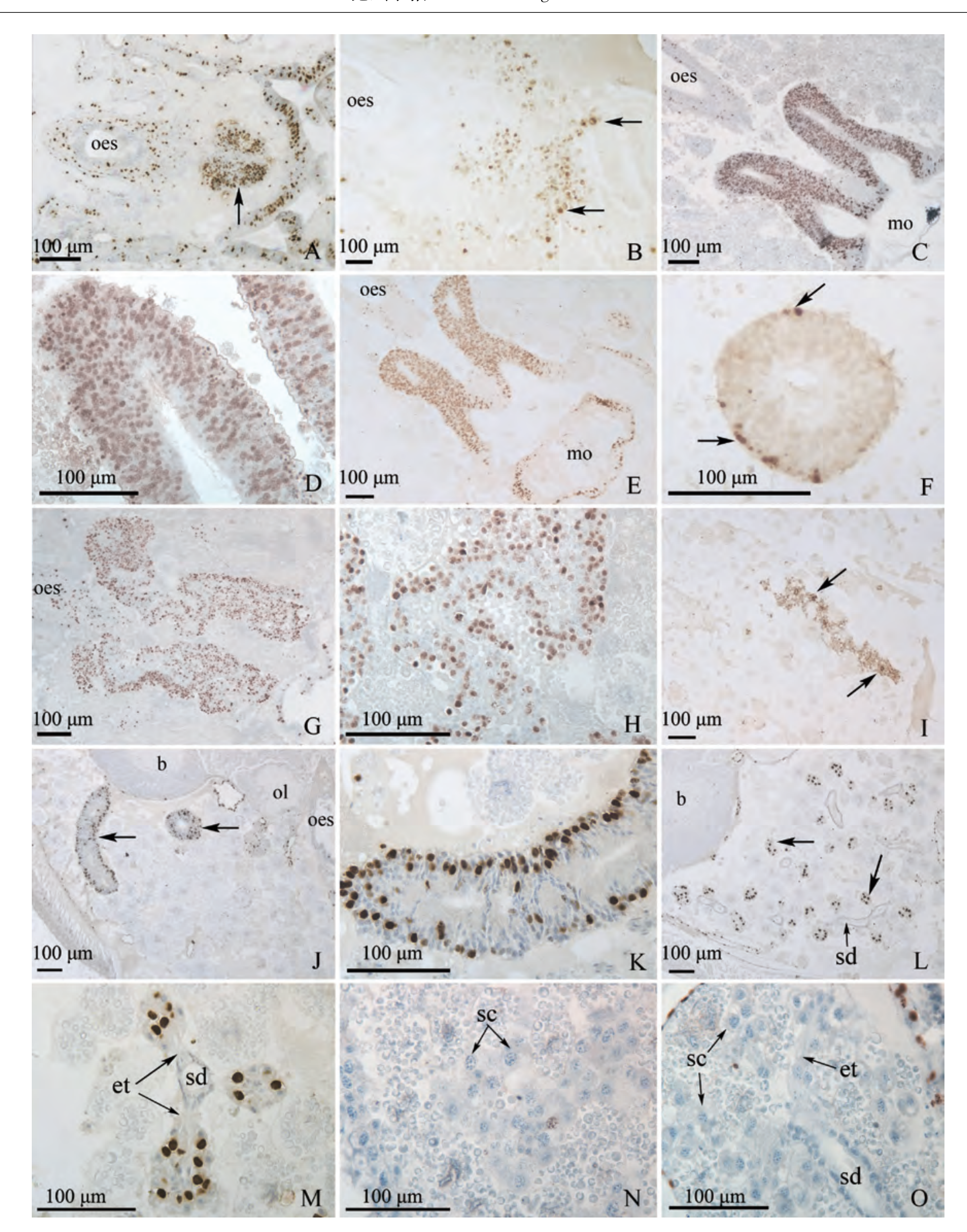


图 1 中华蜜蜂工蜂咽下腺的胚后发育

Fig. 1 Postembryonic development of hypopharyngeal gland of *Apis cerana cerana* worker

A：BrdU 标记工蜂预蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of prepupa；B：TUNEL 标记工蜂预蛹的咽下腺 TUNEL-labeled hypopharyngeal gland of prepupa；C，D：BrdU 标记工蜂 1 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 1-d-old pupa；E：BrdU 标记工蜂 2 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 2-d-old pupa；F：TUNEL 标记工蜂 2 日龄蛹的咽下腺 TUNEL-labeled hypopharyngeal gland of 2-d-old pupa；G，H：BrdU 标记工蜂 3 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 3-d-old pupa；I：TUNEL 标记工蜂 3 日龄蛹的咽下腺 TUNEL-labeled hypopharyngeal gland of 3-d-old pupa；J，K：BrdU 标记工蜂 4 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 4-d-old pupa；L，M：BrdU 标记工蜂 5 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 5-d-old pupa；N：BrdU 标记工蜂 7 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 7-d-old pupa；O：BrdU 标记工蜂 8 日龄蛹的咽下腺 BrdU-labeled hypopharyngeal gland of 8-d-old pupa. sd：咽下腺的分泌管 Secretory duct of hypopharyngeal gland；et：胞外管 Extracellular tubule；sc：分泌细胞 Secretory cell；mo：口器 Mouthpart；ol：嗅叶 Olfactory lobe；b：脑 Brain；oes：食道 Oesophagus. 箭头指示为 BrdU 标记或是 TUNEL 标记的细胞。The arrows denote BrdU-labeled or TUNEL-labeled cells in hypopharyngeal gland.

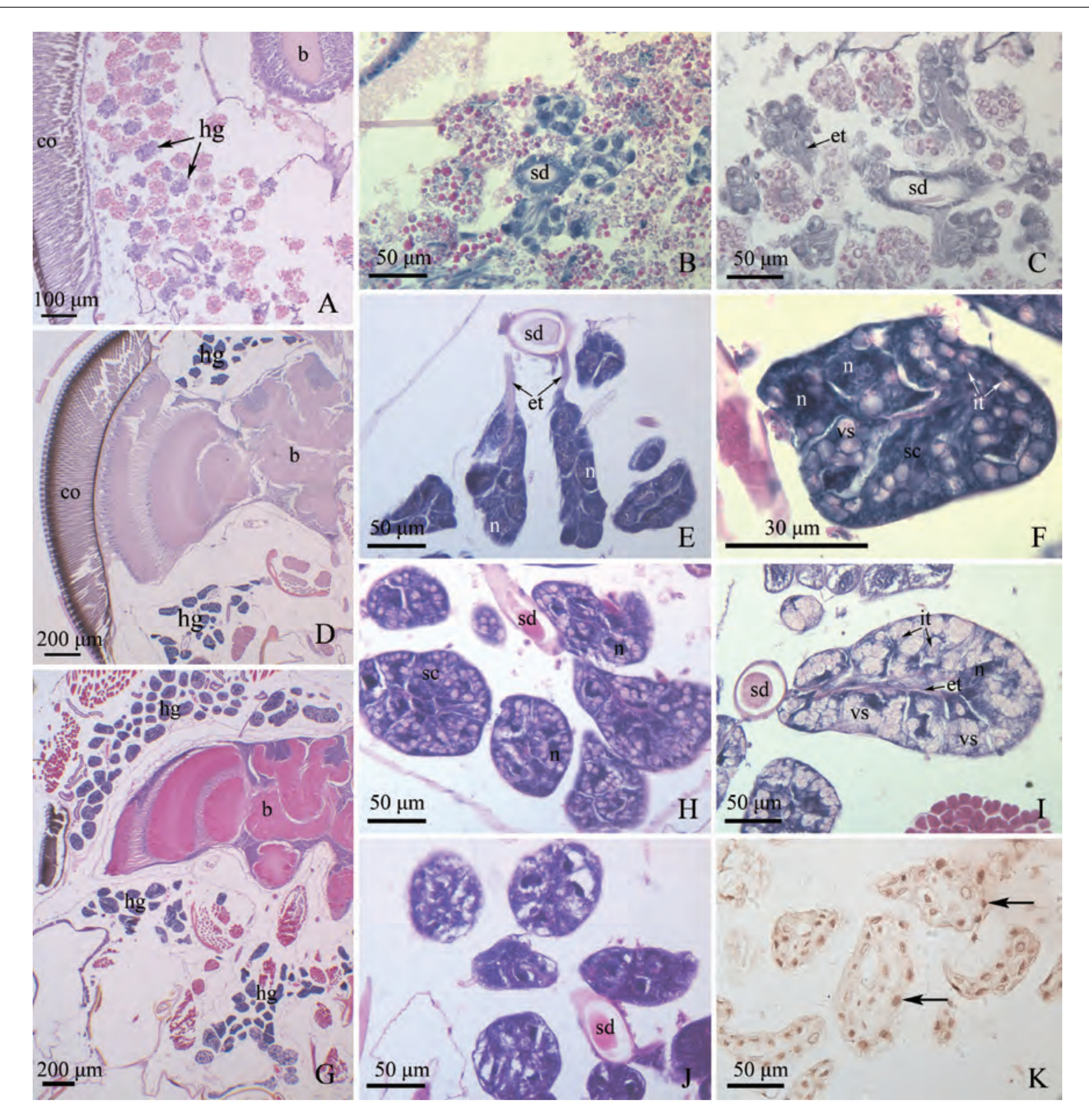


图 2　中华蜜蜂成年工蜂咽下腺的组织结构

Fig. 2　Structural organization of hypopharyngeal gland in *Apis cerana cerana* worker

A, B, C：新羽化工蜂咽下腺的组织结构 Structural organization of the hypopharyngeal gland in newly emerged worker；D, E, F：早期哺育蜂咽下腺的组织结构 Structural organization of the hypopharyngeal gland in young nurse bee；G, H, I：成熟哺育蜂咽下腺的组织结构 Structural organization of the hypopharyngeal gland in old nurse bee；J：采集蜂咽下腺的组织结构 Structural organization of the hypopharyngeal gland in forager；K：TUNEL 标记采集蜂的咽下腺 TUNEL-labeled hypopharyngeal gland of forager. sc：分泌细胞 Secretory cell；n：分泌细胞核 Nucleus of secretory cell；hg：咽下腺 Hypopharyngeal gland；sd：咽下腺的分泌管 Secretory duct of hypopharyngeal gland；it：胞内管 Intracellular tubule；et：胞外管 Extracellular tubule；vs：囊泡 Vesicle；b：脑 Brain；co：复眼 Compound eye.

3　讨论

3.1　中华蜜蜂咽下腺的胚后发育特点

中蜂的咽下腺从预蛹期已经开始分化，到蛹发育早期，可明显看到由口器背侧的体壁内陷形成的 2 个长囊，沿着口-咽部的方向延伸，细胞快速地分裂增殖，有丝分裂遍及整个囊壁。Cruz-Landim 和 Mello（1967）对无刺蜂 *Melipona quadrifasciata* 咽下腺的研究显示，其咽下腺的发育也是从蛹早期开始的，但是是由上咽部腹侧的上皮内陷形成的，而蜜蜂的咽下腺则起源自口器。无刺蜂的咽下腺明显小于中蜂，在白眼蛹阶段，其长度达只有约 200 μm，红眼蛹阶段也只有约 270 μm，这主要是因为无刺蜂的个体（3 ~ 5 mm）明显小于中蜂（10 ~ 13 mm）。BrdU 标记显示，中蜂咽下腺发育早期，囊壁内侧的细胞主要沿切线的方向快速分裂，新产生的细胞被推向外侧，使咽下腺的囊壁不断增厚；也有一些细胞的分裂

轴垂直于腔面,产生的细胞使咽下腺囊不断扩大。到咽下腺发育晚期,囊壁外侧细胞的分裂频次和持续时间都高于内侧细胞。咽下腺早期的发育主要是基于细胞数量的增多,而后期腺体体积的增加则主要是基于细胞体积的增大,包括胞质的增多,内含物成分的变化等,这同蜜蜂唾腺系统的另一个组成部分——上颚腺的胚后发育过程(李兆英, 2014)类似。中蜂腺泡以及胞内、外管的出现大约在蛹发育的第 5 天。细胞增殖活动大约在第 7 天以前就终止了。到蛹发育的末期(P8),咽下腺腺泡都已基本形成,但是到工蜂出房后的 3 d 左右,分泌细胞都没有发完全,一直到出房后的 10 d 左右才充分发育。中蜂咽下腺的胚后发育过程同意蜂类似(Deseyn and Billen, 2005)。

3.2 成年工蜂咽下腺的形态及功能

咽下腺的发育状况同工蜂的行为密切相关。出房 1 – 3 d 的年幼工蜂,主要担任保温孵卵、清理巢房以便蜂王产卵的工作。此时咽下腺还没有发育完全,分泌细胞较小,圆球形,有大的胞核,腺泡的体积较小。分泌细胞形态及腺泡大小同蛹发育末期没有太大变化,细胞也无分泌活动。从第 3 天起,工蜂开始哺育幼蜂,饲喂蜂王,成为哺育蜂。此时工蜂的咽下腺开始发育:分泌细胞体积变大,胞质中出现囊泡,胞核增大,腺泡的体积也增加了近 1 倍,并开始有分泌活动。成熟的哺育蜂(9 – 12 日龄)咽下腺高度发育,分泌细胞中充满了大小不一的囊泡,胞核小,分泌活动旺盛。超微结构研究显示,此时咽下腺分泌细胞的胞质中粗面内质网及线粒体最丰富、最发达,且王浆储存器也最饱满,咽下腺合成和分泌王浆蛋白的功能达到最旺盛的状态(韩胜明, 2002)。成年中蜂咽下腺的发育特点同意蜂类似(Suwannapong *et al*., 2010)。但是中蜂咽下腺每个腺泡的直径(约为 100 μm × 120 μm)明显小于意蜂(约为 120 μm × 180 μm)(马卫华等, 2012),并且每条咽下腺上腺泡的平均数量比意蜂少 60% 以上(曾志将等, 1990),咽下腺中蛋白质的平均含量只有意蜂的 1/3(Suwannapong *et al*., 2010),这些原因都造成了中蜂王浆的产量远低于意蜂。此外,研究结果也显示,中蜂同一个体不同部位咽下腺腺泡的发育状况并不同步,靠近口器部分的腺泡似乎发育的更早、更快,分泌活动也更加活跃。造成咽下腺腺泡发育不同步的原因,还需要进一步的实验加以证明。

研究显示,成熟哺育蜂咽下腺的发育最为丰满,到出房采集时逐渐萎缩退化,到 21 d 左右,采集蜂的咽下腺基本退化完全。采集蜂咽下腺的主要功能是生产各种酶,包括淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、半乳糖苷酶、酯酶、蔗糖酶等等(Ohashi *et al*., 2000),这些酶可将花蜜水解成蜂蜜,有的腺体甚至完全退化、萎缩依然可分泌转化酶。组织形态学以及细胞生物学证据显示,成熟的中蜂采集蜂咽下腺也出现了细胞萎缩,胞质空泡化,胞膜破裂等细胞凋亡特征。但是 Deseyn 和 Billen(2005)在意蜂采集蜂中没有观察到咽下腺的降解;Elaidy(2014)对生活在埃及的意蜂成年工蜂咽下腺发育状况的研究显示,即使到了第 27 日龄的采集蜂,咽下腺依然保持了旺盛的分泌活动,没有看到明显的细胞凋亡迹象,这也说明了咽下腺的发育可能同气候、植被类型(Elaidy, 2014)以及蜂群状况(Ohashi *et al*., 2000; Deseyn and Billen, 2005)有关。但是由于本研究取材的局限性,不同环境因素对中华蜜蜂咽下腺胚后发育的影响还需进一步的实验证明。

3.3 蜜蜂咽下腺细胞凋亡的模式

在昆虫的胚后发育过程中,细胞凋亡普遍存在。发生凋亡的原因主要有以下几个:清除有害的和多余的细胞,清除完成正常使命的和发育不正常的细胞等。在蜜蜂咽下腺发育初期(PP-P2),TUNEL 标记显示了有部分的细胞发生凋亡,而此时也正是细胞快速增殖分裂的阶段;到了咽下腺发育的中后期,凋亡细胞的数量减少,到蛹发育的第 3 天以后,已经观察不到 TUNEL 标记的阳性细胞,直到工蜂成为采集蜂。这一阶段细胞凋亡的原因可能同细胞的快速分裂,细胞数量的大量增加有关,凋亡主要是为了清除由于过快的细胞分裂而产生的多余细胞。类似的细胞凋亡模式,在昆虫其他组织器官(如蜜蜂的视叶)的胚后发育过程中也能看到(李兆英, 2010)。这种类型的细胞凋亡往往同细胞的快速分裂增殖相伴随,增殖最活跃的部分也恰恰是凋亡的高发区。

组织学证据显示,在成年工蜂发育早期(哺育蜂)阶段,咽下腺分泌细胞没有发生凋亡;但是 Silva de Moraes 和 Bowen(2000)通过 Annexin V-FITC 技术观察到在意蜂哺育蜂的咽下腺中有部分细胞呈现为阳性,显示了在形态学上看似正常的腺泡细胞,已经开始出现细胞凋亡的早期症状。而 TUNEL 标记结果仅显示了在采集蜂阶段有细胞的凋亡,这可能同两种实验技术的原理差异有关。到了采集蜂阶段,能明显看到分泌腺细胞的变化:分泌细胞之间的间隙增大;细胞体积变小,细胞变形,皱缩;胞膜破

损，胞质中有大量的空泡，一些细胞的胞核破碎，染色质浓缩等，这些都是典型的细胞凋亡特征。中蜂咽下腺细胞发生凋亡的时间以及特点同意蜂类似（Silva de Moraes and Bowen, 2000）。超微结构研究显示了在这些细胞中含有酸性磷酸酶，并且大部分的空泡化细胞中含有大量明显的自噬体（Deseyn and Billen, 2005）。这个阶段细胞发生凋亡的原因同蛹发育阶段完全不同，主要是对完成使命的衰老细胞的清除，这同蜜蜂蕈形体胚后发育过程中细胞凋亡的模式类似（李兆英和奚耕思，2011）。

参考文献（References）

Bowen ID, Mullarkey M, Morgan SM, 1996. Programmed cell death in the salivary gland of the blow fly *Calliphora vomitoria*. *Microsc. Res. Tech.*, 34: 202–217.

Cruz-Landim CD, Mello MLS, 1967. The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym., Apoidea). II. Development of the salivary glands system. *J. Morphol.*, 123(4): 481–502.

Deseyn J, Billen J, 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 36(1): 49–57.

Du ZL, Zhang ZB, 1984. An electron microscopic observation on the hypopharyngeal glands of the worker honey bee, *Apis cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 27(4): 392–395. [杜芝兰，张宗炳，1984. 中华蜜蜂咽下腺的电镜观察. 昆虫学报，27(4): 392–395]

Elaidy WKM, 2014. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers with age. *J. Apicult. Res.*, 53(3): 377–384.

Han SM, 2002. Research on the gland morphology in the head of worker honeybee, *Apis mellifera*. *China Beekeeping*, 53(4): 4–6. [韩胜明，2002. 意大利工蜂头部腺体的形态结构研究. 中国养蜂，53(4): 4–6]

Li ZY, 2010. Programmed cell death of developing optic lobes in the honey bee (*Apis cerana cerana*). *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(4): 680–684. [李兆英，2010. 中华蜜蜂工蜂视叶胚后发育过程中的细胞凋亡. 昆虫知识，47(4): 680–684]

Li ZY, 2014. Tissue structure and postembryonic development of the mandibular glands in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 411–417. [李兆英，2014. 中华蜜蜂上颚腺的组织结构及其胚后发育. 昆虫学报，57(4): 411–417]

Li ZY, Xi GS, 2011. Observation of neurogenesis and programmed cell death in the mushroom bodies of the honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae), using immunohistochemistry method. *Acta Entomologica Sinica*, 54(6): 657–663. [李兆英，奚耕思，2011. 基于免疫组织化学方法的中华蜜蜂蕈形体胚后发育过程中细胞增殖和凋亡的观察. 昆虫学报，54(6): 657–663]

Ma WH, Guo YP, Zhang XM, Shen JS, Zhang YY, 2012. The microscopic observation on the hypopharyngeal gland of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Environmental Entomology*, 34(4): 472–477. [马卫华，郭亚平，张小民，申晋山，张云毅，2012. 意大利工蜂咽下腺结构观察. 环境昆虫学报，34(4): 472–477]

Ohashi K, Sasaki M, Sasagawa H, Nakamura J, Natori S, Kubo T, 2000. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. *Zool. Sci.*, 17(8): 1089–1094.

Shi YX, Li QR, Huang ZJ, Zeng WN, Hu ZY, Lei SY, Deng XJ, Yang WY, Cao Y, Feng QL, 2009. Autophagy and apoptosis in insect cells during metamorphosis. *Acta Entomologica Sinica*, 52(1): 84–94. [史艳霞，李庆荣，黄志君，曾文年，胡占英，雷淑英，邓小娟，杨婉莹，曹阳，冯启理，2009. 昆虫变态发育过程中的细胞自噬和凋亡. 昆虫学报，52(1): 84–94]

Silva de Moraes RL, Bowen ID, 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biol. Int.*, 24: 737–743.

Silva-Zacarin ECM, Tomaino GA, Brocheto-Braga MR, Taboga SR, Silva de Moraes RLM, 2007. Programmed cell death in the larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *J. Biosci.*, 32(2): 309–328.

Snodgrass RE, 1956. Anatomy of the Honey Bee. Cornell University Press, Ithaca, New York. 28–30.

Suwannapong G, Chaiwongwattanakul S, Benbow ME, 2010. Histochemical comparison of the hypopharyngeal gland in *Apis cerana* Fabricius, 1793 workers and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 workers. *Psyche*, 2010: 1–7.

Zeng ZJ, Xi FG, Wen ZZ, Li YG, 1990. Histochemical comparison of the hypopharyngeal gland in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Apiculture of China*, (5): 6–7. [曾志将，席方贵，温泽章，李玉谷，1990. 意蜂与中蜂王浆腺形态的研究. 中国蜂业，(5): 6–7]

（责任编辑：赵利辉）